

Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН

PONTUS EUXINUS
ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ : XII



ПОНТ ЭВКСИНСКИЙ – 2021

XII Всероссийская научно-практическая конференция молодых учёных с международным участием по проблемам водных экосистем, посвященная 150-летию Севастопольской биологической станции – ФИЦ «Институт биологии южных морей имени А. О. Ковалевского РАН»

Материалы конференции

Севастополь, 20–24 сентября 2021 г.

Севастополь
ФИЦ ИнБЮМ
2021

ВОДНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ РЕСУРСЫ, БИОТЕХНОЛОГИЯ И АКВАКУЛЬТУРА

ФУНКЦИОНАЛЬНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ГЕМОЦИТОВ ТИХООКЕАНСКОЙ УСТРИЦЫ (*CRASSOSTREA GIGAS*) ПРИ РАНЖИРОВАННОЙ ГИПОКСИИ

Андреева А. Ю., Кладченко Е. С.

ФИЦ «Институт биологии южных морей им. А. О. Ковалевского РАН», г. Севастополь

Ключевые слова: тихоокеанская устрица, гемоциты, клеточный иммунитет, гипоксия

В течение последних 50 лет отмечено существенное увеличение средней температуры вод Мирового океана, а также значительные годовые колебания содержания растворенного кислорода на глубинах до 100 м в тропических, субполярных и субтропических регионах. Формирование и распространение зон прибрежной гипоксии в водах Мирового океана широко известно мировой науке. Модели изменения климата предсказывают общее снижение уровня растворенного кислорода в водах Мирового океана и дальнейшее распространение зон кислородного минимума в условиях глобального потепления [1]. Наиболее существенным является формирование периодических или перманентных гипоксических акваторий в шельфовой континентальной зоне, поскольку она интенсивно используется для рыбного промысла и ведения аквакультурного хозяйства. В настоящее время Крымское побережье Черного моря интенсивно используется для аквакультурного выращивания двустворчатых моллюсков. Хотя Черноморское побережье Крыма в настоящее время характеризуется благоприятным регионом, с точки зрения концентрации растворенного кислорода в поверхностном слое воды (100 м), наличие термоклина, общая тенденция роста средней годичной температуры воды [2] могут приводить к возникновению локальных зон гипоксии, особенно в весенне-летний период, когда прогрев воды максимален.

Цель настоящей работы: исследовать влияние дефицита кислорода разной степени и продолжительности на параметры неспецифического иммунитета тихоокеанской устрицы (*Crassostrea gigas*), являющегося объектом интенсивной региональной аквакультуры.

Для решения поставленных задач были отобраны 60 устриц (94 ± 3.5 мм, 23 ± 4.2 г). Моллюски были получены на марикультурной ферме, расположенной в г. Севастополь. После транспортировки устрицы были размещены в емкостях с проточной морской водой из расчета 3–5 л на моллюска на период акклиматизации к лабораторным условиям. По окончании периода акклиматизации (2 недели) моллюсков помещали в емкость с морской водой, продуваемой газообразным азотом до концентрации кислорода 0.3 мг л^{-1} . Спустя 24 часа и 72 часа инкубации у устриц отбирали гемолимфу из сердечного синуса (0.5–1.0 мл). Клетки отмывали в морской воде путем центрифугирования (350 г в течение 5 мин). После отмывки клетки ресуспендировали в морской воде (концентрация гемоцитов $1\text{--}2 \cdot 10^6$ на мл). Для идентификации типов клеток на проточном цитометре Beckman Coulter FC500 готовую суспензию окрашивали ДНК-красителем SYBR Green I (финальная концентрация в пробе 10 мкмоль л^{-1} , время инкубации - 40 мин в темноте).

Оценка способности гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода проводилась на основании оценки флуоресценции красителя 2-7-дихлорфлуоресцеин-диацетата (DCF-DA). 1 мл суспензий гемоцитов инкубировали с 10 мкл раствора DCF-DA в течение 40 мин в темноте. Финальная концентрация красителя в пробе составляла 10 мкмоль л⁻¹. Флуоресценция красителя анализировалась в канале FL1 (зеленая область спектра). Смертность гемоцитов определяли при помощи флуоресцентного красителя propidium iodide (PI). К 1 мл суспензии гемоцитов добавляли 10 мкл раствора PI (Sigma Aldrich) и инкубировали в темноте в течение 40 мин при 4 °С. Доля мертвых гемоцитов в общем числе гемоцитов оценивали по гистограммам флуоресценции PI в канале FL4 цитометра.

Анализы на фагоцитоз проводили, добавляя суспензии зимозана (клеточные стенки *Saccharomyces cerevisiae*, зимозан А, Sigma) в соотношении зимозана к гемоцитам 10/1. Суспензию инкубировали 90 мин при комнатной температуре (20–23) °С в темноте. Интенсивность фагоцитоза оценивали по флуоресценции красителя в канале FL1 (зеленая область спектра).

Гемолимфа устриц содержала 3 типа клеток (агранулоциты, гиалиноциты и гранулоциты), различающихся по размеру, форме и степени гранулированности цитоплазмы. Показано, что кратковременный недостаток кислорода (24 ч) оказывает стимулирующий эффект на иммунные функции гемоцитов (способность к спонтанной продукции активных форм кислорода). У агранулярных клеток гемолимфы отмечена тенденция к росту числа активных форм кислорода, а у гранулоцитов показатель вырос почти в 2 раза. Спустя 72 ч воздействия гипоксии у всех типов клеток гемолимфы отмечено достоверное снижение флуоресценции DCF-DA, что говорит об уменьшении уровня активных форм кислорода в цитоплазме. Наиболее существенное снижение отмечено у гранулоцитов. Общая способность гемоцитов устриц к фагоцитозу уменьшалась в условиях гипоксии. Однако уменьшение интенсивности фагоцитоза в меньшей степени зависело от недостатка кислорода, в сравнении со способностью клеток к генерации активных форм кислорода. Нами отмечена лишь тенденция к снижению интенсивности фагоцитоза, достоверных различий между пробами не выявлено. Показано, что гипоксия не оказывала влияния на уровень смертности гемоцитов, который сохранялся на уровне контрольных значений во всех экспериментальных группах.

Таким образом, суточная гипоксия оказывала стимулирующее действие на клеточный иммунитет устриц, вызывая интенсификацию клеточного дыхания, сопровождающегося ростом спонтанной продукции активных форм кислорода в цитоплазме гемоцитов. Длительное воздействие недостатка кислорода приводило к угнетению клеточного иммунитета устриц за счет снижения способности гемоцитов к спонтанной продукции активных форм кислорода, а также их фагоцитарной активности.

Работа выполнена в рамках гранта Президента Российской Федерации для молодых ученых кандидатов-наук (проект № МК-609.2020.4).

Список литературы

1. Diaz R. J., Rosenberg R. Introduction to environmental and economic consequences of hypoxia // Journal of Water Resources Development. 2011. Vol. 27, iss 1. P. 71–82. <https://doi.org/10.1080/07900627.2010.531379>
2. Кондратьев С. И., Видничук А. В. Локальная сезонная гипоксия и образование сероводорода в придонных водах Севастопольской бухты в 2009–2019 годах // Экологическая безопасность прибрежной и шельфовой зон моря. 2020. Т. 2. С. 106–121. <https://doi.org/10.22449/2413-5577-2020-2-107-121>